

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08683

研究課題名(和文) 自己免疫性疾患患者に発生するリンパ増殖性疾患の病態解明と治療効果予測因子の同定

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying lymphoproliferative disorders for targeted therapy in patients with autoimmune diseases

研究代表者

畑中 佳奈子 (Hatanaka, Kanako)

北海道大学・大学病院・特任講師

研究者番号：10399834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫抑制剤で治療中の自己免疫性疾患(AID)患者に発生するびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)の腫瘍微小環境に着目し、解析を行った。非AID(nAID)群と比較し、AID群ではFOXP3陽性制御性T細胞浸潤の多い症例割合が有意に高かった。また、遺伝子発現プロファイル解析では、AID/nAID群間で7遺伝子の発現に有意差が見られた。さらに、AID群内のEBV感染の有無による解析で有意差の認められた24遺伝子発現のうちTNFRSF8(CD30)など4つの遺伝子で高発現が認められ、腫瘍微小環境の解明や今後の治療戦略の一助となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではAID-DLBCLの腫瘍微小環境に着目し、nAID-DLBCLとの比較やEBV感染の有無を含めた解析を行った。腫瘍微小環境の浸潤細胞の密度に大きな差異は認められなかったが、遺伝子発現プロファイル解析では複数の遺伝子発現に違いがみられたことから、形態的には大きな差異のない両者においても腫瘍微小環境に違いがみられることが判明し、かつその中高発現を示す遺伝子をターゲットにした治療薬がすでに他の腫瘍で臨床導入されていることから、本疾患における新たな治療法の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the tumor microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in patients with autoimmune disease (AID) treated with immunosuppressants. The number of patients with increased FOXP3-positive regulatory T-cell infiltration was significantly higher in the AID group than in the non-AID (nAID) group. Gene expression profiling revealed a significant difference in 7 genes between AID and nAID groups. In addition, among the 24 differentially expressed genes between the AID group with and without EBV infection, 4 genes including TNFRSF8 (CD30) showed increased expression. These results further our understanding of the tumor microenvironment and can be useful for the development of therapeutic strategies for AID-DLBCL patients in the future.

研究分野：人体病理

キーワード：リンパ増殖性疾患 自己免疫性疾患 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 腫瘍微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) AID-LPD は、methotrexate (MTX) 投与中の関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 患者に発生する LPD (MTX 関連 LPD) として報告され、その後 RA 治療に MTX の使用につれ報告が増加し、疾患概念として確立された [1]。AID には、RA のほか、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、重症筋無力症、及び潰瘍性大腸炎・クローン病などの炎症性腸疾患、尋常性乾癬などの多くの炎症性疾患が含まれ、またその一部は特定疾患治療研究事業対象疾患に指定されている。このうち罹患者数の推計が約 70 万人と最も多い RA においては治療法開発が進んでおり、本邦においては、疾患の活動性制御を目的とした MTX 投与が 1999 年の承認以降は治療薬として用いられるようになり、現在でも RA の中心的治療薬として幅広く使用されている。さらに TNF- $\alpha$  阻害剤をはじめとする生物学的製剤が近年開発・臨床導入され、治療の目的は関節破壊の抑止、機能障害への阻止へと変遷してきている。

(2) 近年、これらの長期間 MTX 投与が行われた AID 患者において、LPD が発症することが注目されるようになり、MTX 以外の抗ヒト TNF- $\alpha$  抗体などの生物学的製剤投与後にも LPD の発症が報告され [2]、薬剤による免疫抑制作用に関連した医原性疾患の一つとして認識されるようになってきた。2008 年の改訂 WHO 血液腫瘍分類においても独立した疾患単位として記載されている。LPD は、腫瘍性病変、非腫瘍性病変、境界領域病変に大別されるが、このうち臨床的に問題となるのは、腫瘍性病変である悪性リンパ腫である。興味深いことにこれらの約 30% の症例では、上述の薬剤の投与中止のみで、LPD が寛解 (退縮) することが報告されている [3]。薬剤の中止のみでの腫瘍退縮に関しては、EBV 陽性や組織学的に古典的ホジキンリンパ腫の形態を示す症例が多い傾向があるとの報告が示されているものの、その原因についてはわかっていない。さらにこれらの寛解症例の約半数は再発することから、慎重な経過観察が必要となる。現在、RA 患者およびその治療に伴う LPD の罹患者数は増加傾向にあり、正確な病態把握と、それを踏まえた病理診断によるサブタイピングおよび治療効果予測法の確立は、患者 QOL 上、重要かつ急務となっている。

### 2. 研究の目的

自己免疫性疾患 (autoimmune disease; AID) 患者の治療では、様々な免疫抑制剤や生物学的製剤が使用されるが、それに伴いリンパ増殖性疾患 (lymphoproliferative disorder; LPD) が発症することが知られている。この AID-LPD は比較的新しい概念であり、成因として、Epstein-Barr ウイルス (EBV) への感染、関節リウマチなど AID 治療薬による免疫低下などが指摘されているが、AID-LPD の病態解明や治療選択に関する研究は未だ十分に進んでいない。本研究では、AID-LPD のうち、とくに臨床的に問題となる悪性リンパ腫 (LPD の亜型として大部分の症例数を占める組織型であるびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫: DLBCL) に着目し、(a) 通常非 AID (nAID) 悪性リンパ腫との比較により、腫瘍微小環境内のがん免疫関連細胞動態および遺伝子発現の特徴を明らかにし、(b) 治療標的候補分子の同定およびその臨床病理学的検証を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 対象症例: 2003-2017 年北海道大学及び共同研究施設にて病理診断・治療された DLBCL 症例のうちホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体が利用可能な 145 例 (AID-DLBCL 群; 21 例、nAID-DLBCL 群; 124 例) を対象とした。

(2) がん免疫関連細胞の動態評価: 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) と腫瘍関連組織球 (TAM) の細胞密度 (1mm<sup>2</sup> 当たりの細胞数) を評価するため、CD4, CD8, CD163, FOXP3 の免疫組織化学 (IHC) 解析を行った。IHC は常法 (Dako Envision FLEX system; Agilent 社) に従って行い、腫瘍中心部に浸潤する各陽性細胞密度の中央値をカットオフとして高値群 (H) と低値群 (L) の 2 群に分け解析を行った。

(3) がん免疫関連遺伝子の発現プロファイルの取得: DLBCL 145 症例から、AID-DLBCL 21 例 (EBER 陽性 13 例、EBER 陰性 8 例)、nAID-DLBCL 15 例 (EBER 陽性 5 例、EBER 陰性 10 例) 計 36 例を選択し、FFPE 組織検体からの RNA 抽出 (QIAasymponey, QIAGEN 社) を行った。抽出 RNA の収量および純度を確認した後、PanCancer Immune Profiling パネルおよび nCounter System (NanoString Technologies 社) を用いたがん免疫関連遺伝子の発現プロファイル解析を行った。得られたプロファイルデータは、nSolver™ Analysis Software を用いてデータ解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) nAID-および AID-DLBCL 間の臨床病理学的比較: nAID-DLBCL 群 (124 例) と比較し、AID-DLBCL 群 (21 例) は女性ならびにリンパ節外発生がやや多く、また non-germinal center (nGC) B-cell like の性質を有し、EBER 陽性症例の割合が多かった。このうち、AID-DLBCL の有無と性別、EBER 陽性/陰性の間には関連が認められた ( $p=0.0367$ ,  $p<0.0001$ )。

(2) 腫瘍微小環境内の TIL および TAM の細胞動態比較：AID-DLBCL 群と nAID-DLBCL 群における TIL および TAM の細胞密度の比較検討を行ったところ、FOXP3-L/H の割合は、AID-DLBCL 群では 19%/81%であったのに対し、nAID-DLBCL 群では 51%/49%と有意差が認められた ( $p=0.0071$ )。一方、CD4-L/H、CD8-L/H、CD163-L/H の割合については、AID-DLBCL 群と nAID-DLBCL 群で有意差は認められなかった(図 1)。

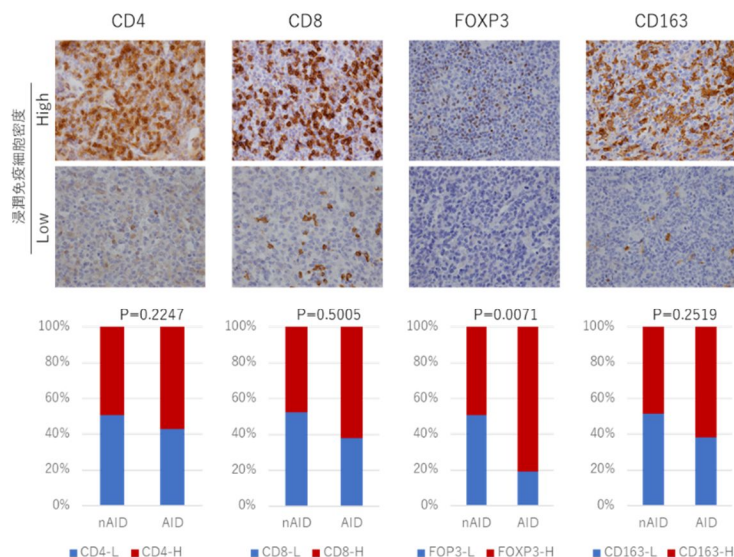


図1 nAID-およびAID-DLBCLの腫瘍微小環境におけるTILおよびTAMの細胞動態比較

(3) 腫瘍微小環境におけるがん免疫関連遺伝子の発現プロファイル：nCounter System を用いたがん免疫関連遺伝子の発現解析において、AID-DLBCL 群と nAID-DLBCL 群、EBER 陽性群と陰性群の 4 群でのクラスター解析を行ったところ、3 クラスター (CL) に分かれ、このうち、CL1 には AID-DLBCL/EBER 陽性例が多く含まれた(図 2)。また以下の 2 群間比較解析を行い、発現差が 2 倍以上かつ  $p < 0.01$  の遺伝子を抽出した； AID-DLBCL 群・nAID-DLBCL 群間の比較では、7 遺伝子 (CCL15, FOXP1, ICAM4, IL3, PMCH, SOCS1, TNFSF13) に有意な発現の変動が認められた。EBER 陽性・陰性群の比較では、6 遺伝子 (CARD11, CXCL1, NFATC1, SLC11A1, TLR9, TNFRSF8) に有意な発現の変動が認められた。AID-DLBCL 群内の EBER 陽性・陰性亜群間の比較では、24 遺伝子に有意な発現差を認め、このうち 4 遺伝子 (IL8, TREM1, IL1B, TNFRSF8) については EBER 陽性群で 6 倍以上の高発現を認めた。一方、nAID-DLBCL 群内で EBER 陽性・陰性亜群間の比較では、2 遺伝子 (CD3EAP, NFATC1) に有意差を認めた。

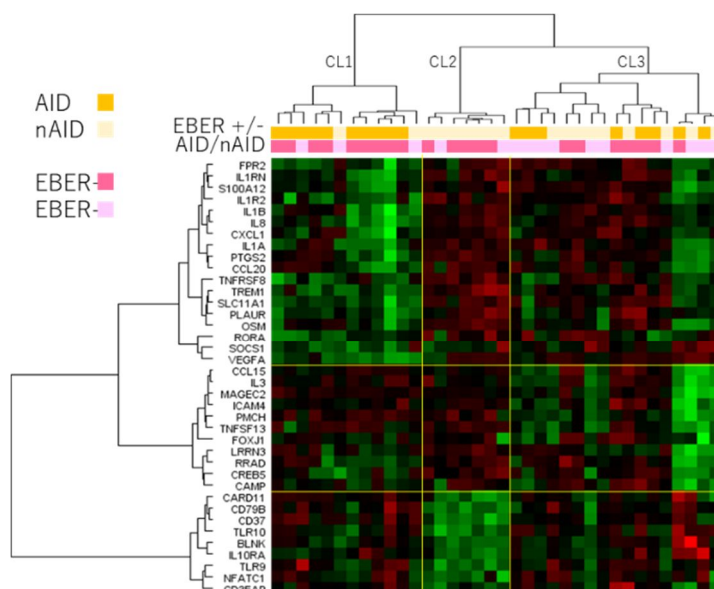


図2 nAID-およびAID-DLBCLにおける階層的クラスター解析

(4) AID-DLBCL 群内の EBER 陽性・陰性亜群間の比較：がん免疫関連遺伝子の発現プロファイリングにおいて、発現変動の大きかった 6 遺伝子のひとつに、分子標的治療薬 brentuximab vedotin の標的分子である TNFRSF8/CD30 が同定された。そこでタンパクレベルでの発現を IHC 解析により行ったところ、遺伝子発現と一定の相関性が観察された。

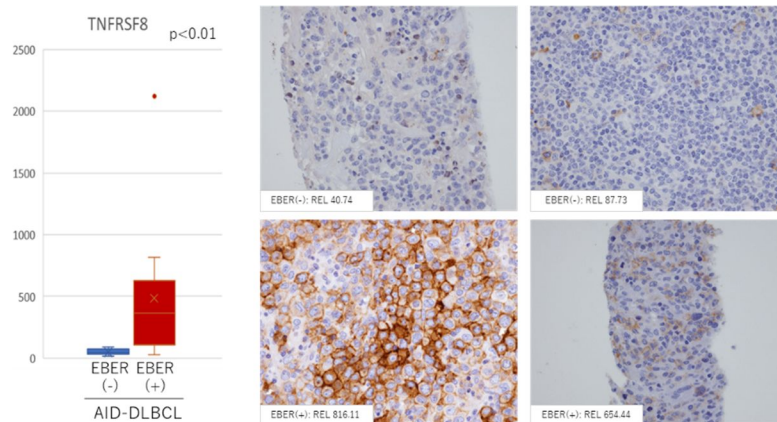


図3 AID-DLBCLのEBER陽性およびEBER陰性例間のTNFRSF8/CD30タンパク発現比較  
REL; relative expression level

(5) 以上の結果より、AID-DLBCLにおける腫瘍微小環境は、nAID-DLBCLとの比較において、TILおよびTAMの細胞動態では限定的で大差は認められなかったものの、がん免疫関連遺伝子では異なった発現パターンを示したことから、AID-DLBCLに特徴的な発現プロファイルを有することが示唆された。とくに有意な発現差を認めたSOCS1は、内因性Treg (naturally occurring Treg; nTreg) 活性化に伴うTreg数に調節に関与していることから、AID-DLBCLでみられたFOXP3-H例の増加との関連性が考えられた。またこのプロファイルについては、AID-DLBCL群内のEBER陽性・陰性亜群間でも特徴的なパターンを示したことから、AID-DLBCLの病態把握には遺伝子発現プロファイルに加えEBV感染状態を加えたサブタイピングが必要と考えられた。また今回AID-DLBCL群のEBER陽性・陰性亜群間で遺伝子発現差が認められたTNFRSF8はTNF Superfamilyの一つでCD30としても知られている分子である。現在、抗CD30治療薬はホジキンリンパ腫やT細胞性リンパ腫を適応症として承認されている。今回EBER陽性AID-DLBCLにおいてその発現が高いことが明らかとなり、この亜群に対し当該薬剤の効果が期待されることから、今後これを念頭に置いたさらなる前臨床的検討が必要と考えられる。

< 引用文献 >

[1] Mariette X, Cazals-Hatem D, Warszawski J, et al. Lymphomas in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: a 3-year prospective study in France. *Blood*, 2002; 99: 3909-15

[2] Brown SL, Greene MH, Gershon SK, et al. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3151-8.

[3] Salloum E, Cooper DL, Howe G, et al. Spontaneous regression of lymphoproliferative disorders in patients treated with methotrexate for rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *J Clin Oncol.* 1996; 14: 1943-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashiguchi J, Onozawa M, Okada K, Amano T, Hatanaka KC, Nishihara H, Sato N, Teshima T	4. 巻 41
2. 論文標題 Quantitative detection of IKZF1 deletion by digital PCR in patients with acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Lab Hematol	6. 最初と最後の頁 e38-e40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ijlh.12945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 吹矢美佳, 丸川克司, 清水智宏, 宮越里絵, 安孫子光春, 畑中佳奈子, 三橋智子, 松野吉宏	4. 巻 59
2. 論文標題 胸水中にIgG4陽性形質細胞浸潤を証明できた、IgG4関連疾患と考えられる1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床細胞学会雑誌	6. 最初と最後の頁 50-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashiguchi J, Onozawa M, Naka T, Hatanaka KC, Shiratori S, Sugita J, Fujimoto K, Matsuno Y, Teshima T	4. 巻 20
2. 論文標題 Re-infection of toxoplasma gondii after HSCT presenting lymphadenopathy resembling recurrence of lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transpl Infect Dis	6. 最初と最後の頁 e12892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tid.12892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanno-Okada H, Takakuwa E, Tagawa Y, Kase S, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Namba K, Mitsuhashi T, Matsuno Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Cytopathologic findings of cell block materials from the vitreous: Diagnostic distinction between intraocular lymphoma and non-lymphomatous diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 342-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura H, Sugai T, Kato M, Hatanaka KC, Atsumi T	4. 巻 35
2. 論文標題 Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma with haemophagocytic syndrome during tocilizumab therapy for juvenile idiopathic arthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	6. 最初と最後の頁 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Shinkuma S, Fujimoto K, Hatanaka KC, Ujiie H, Nomura T, Fujita Y, Abe R, Matsuno Y, Shimizu H	4. 巻 56
2. 論文標題 Late-onset skin involvement on the forehead in multicentric Castleman disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e152-e153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.13559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanaya M, Endo T, Hashimoto D, Endo S, Takemura R, Okada K, Hatanaka KC, Matsuno Y, Teshima T	4. 巻 106
2. 論文標題 Diffuse large B-cell lymphoma with a bulky mass in the cranial vault	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 147-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2229-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiratori S, Fujimoto K, Nishimura M, Hatanaka KC, Kosugi-Kanaya M, Okada K, Sugita J, Shigematsu A, Hashimoto D, Endo T, Kondo T, Abe R, Hashino S, Matsuno Y, Shimizu H, Teshima T.	4. 巻 34
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning for mycosis fungoides and Sezary syndrome.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 9-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2162.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaito M, Nagatsu A, Oura T, Watanabe M, Aoyagi T, Suzuki T, Shimamura T, Kamiyama T, Sato N, Sugita J, Hatanaka K, Bashuda H, Habu S, Demetris AJ, Okumura K.	4. 巻 64
2. 論文標題 A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 632-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.28459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 畑中 佳奈子, 宮島 直人, 畑中 豊, 篠原 信雄, 松野 吉宏
2. 発表標題 血管筋脂肪腫; 結節性硬化症との関連を中心に
3. 学会等名 第105回日本病理学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 桑原 健, 畑中 豊, 岡田 宏美, 清水 知浩, 奥村 麻美, 平野 裕子, 畑中 佳奈子, 樋田 泰浩, 加賀 基知三, 松野 吉宏
2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるPD-L1とAKR1B10発現の関連性に関する検討
3. 学会等名 第105回日本病理学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 畑中佳奈子, 松野吉宏	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社文光堂	5. 総ページ数 136-140 (総頁数464頁)
3. 書名 マントル細胞リンパ腫 (「リンパ腫アトラス」第5版)	



1. 著者名 畑中佳奈子、松野吉宏	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社文光堂	5. 総ページ数 164-167 (総頁数464頁)
3. 書名 原発性縦隔 (胸腺) 大細胞型B細胞リンパ腫 (「リンパ腫アトラス」第5版)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	畑中 豊  (Hatanaka Yutaka)  (30589924)	北海道大学・大学病院・特任准教授    (10101)	